

А.А. Ярилин, В.Х. Хавинсон, В.О. Полякова, Н.С. Линькова и И.М. Кветной

ИЗМЕНЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ТИМОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Отдел патоморфологии (зав. — проф. И.М. Кветной), Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии
СЗО РАМН, e-mail: kvetnoy48@mail.ru

Проведено исследование изменений процессов дифференцировки, пролиферации и апоптоза кортикальных тимоцитов в культуре тимуса плодов человека под действием пептидных биорегуляторов Т-32 и Т-38. Показано, что пептиды Т-32 и Т-38 усиливают дифференцировку незрелых кортикальных тимоцитов $CD4^+CD8^+$ в направлении регуляторных Т-клеток, повышают их пролиферативную активность и снижают уровень апоптоза. Кроме того, указанные пептиды стимулируют пролиферативную и антиапоптотическую активность зрелых регуляторных Т-клеток $CD4^+CD25^+$.

Ключевые слова: тимоциты, дифференцировка, пролиферация, апоптоз, пептиды

Тимус является центральным органом иммунной системы, играющим ведущую роль в формировании клеточного иммунитета [7]. Выраженное снижение функциональной активности этого органа у человека наблюдается с периода полового созревания и сопряжено с его ранней инволюцией [1, 2]. Основным фактором, отражающим инволютивные процессы в тимусе, является уменьшение числа кортикальных тимоцитов и зрелых Т-лимфоцитов [2, 6]. Возрастное снижение функциональной активности тимуса является основной причиной иммунодефицитных состояний, заболеваний, связанных с дисфункцией иммунной системы [11,13]. Поэтому актуальной задачей иммунологии и геронтологии является поиск препаратов, способных восстанавливать активность тимуса при его инволюции [5, 6, 8–10, 12]. Получен ряд лекарственных препаратов, представляющих собой поли- и олигопептиды, которые способны восстанавливать активность иммунной системы при радиационном и естественном старении и не вызывают привыкания, а также аллергических реакций [4, 5].

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН на основе анализа аминокислотной последовательности полипептидных экстрактов из тимуса и сосудов крупного рогатого скота сконструированы пептиды Т-32 и Т-38. Установлено, что эти пептиды усиливают экспрессию маркеров дифференцировки эпителиальных клеток тимуса — белков Рах1, Ноха3 и TLP в культуре клеток. Указанный эффект был более выражен в старых культурах (8 пассажей) по сравнению с молодыми культурами (1 пассаж) [1]. Кроме того, было изучено влияние пептидов Т-32 и Т-38 на стволовые $CD34^+$ -клетки костного мозга. Показано, что пептид Т-38 стимулирует экспрессию маркера миелоидных клеток CD14

и В-лимфоцитов CD19 в костном мозгу, тогда как для пептида Т-32 стимулирующее действие выявлено только в отношении $CD19^+$ -клеток [1]. В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка влияния синтетических пептидных биорегуляторов Т-32 и Т-38 на дифференцировку кортикальных тимоцитов в зрелые Т-регуляторные клетки.

Материал и методы. Объектом исследования служили культуры клеток тимуса плодов человека (14–26 нед внутриутробного развития) на следующих стадиях их дифференцировки: незрелые кортикальные клетки ($CD4^+CD8^+$) и зрелые регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+$).

Образцы культур были получены из лаборатории клеточной иммунологии Института иммунологии Федерального медико-биологического агентства. Было исследовано 4 контрольных образца культур и 12 экспериментальных образцов, которые инкубировали с синтетическими трипептидами Т-32 и Т-38 в разовой дозе 200 нг/мл в течение 1 ч при 37 °С.

Для исследования функциональной активности клеток в указанных образцах проведено изучение экспрессии проапоптотического белка р53, антиапоптотического протеина MCL-1 и фактора пролиферации Ki-67. На этих же образцах клеточных культур проведено ультраструктурное исследование методом трансмиссионной электронной микроскопии с использованием уранаффиновой реакции.

Приготовление культур тимоцитов на исследуемых стадиях их дифференцировки для иммуноцитохимических и электронно-микроскопических исследований осуществляли по следующей схеме:

1. Суспензию клеток осаждали путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 3 мин. Полученный осадок клеток объемом 0,05–0,2 мл ресуспендировали в 3 мл 2,5% раствора глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4). Через 5 мин суспензию клеток центрифугировали при 1000 об/мин; клетки отмывали 0,1М фосфатным буфером в течение 2 мин и вновь ресуспендировали в 6 мл альдегидного фиксатора. После этого содержимое каждой пробы разделяли на 2 пробирки по 3 мл в каждой и фиксировали в течение 30 мин.

2. Клетки промывали 3 раза по 10 мин 0,1М фосфатным буфером. На этой стадии образцы для электронно-

микроскопического исследования дополнительно фиксировали 1% четырехокисью осмия в течение 45 мин.

3. Клетки обезживали 70% этанолом (3 раза по 10 мин), а для электронной микроскопии клетки дополнительно ресуспендировали в 2% уранилацетате в течение 12 ч.

4. Образцы последовательно обезживали 96% и 100% этанолом, затем 100% ацетоном (3 раза по 5 мин в каждом растворе). В течение 1 ч суспензию клеток пропитывали в смеси ацетона и эпона (1:1).

5. В пластиковые заливочные капсулы добавляли по 1 капле смеси эпона. Осадок клеток объемом 1 мм³ вносили в заливочные капсулы и оставляли на 12 ч. Затем капсулы центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин для осаждения клеток и ставили в термостат при 56° С в течение 2 сут.

Полутонкие срезы (1 мкм) и ультратонкие срезы (70 нм) готовили на ультрамикротоме LKB-7A (LKB, Швеция).

Для иммуноцитохимического исследования полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим–азуром II–основным фуксином, а также иммуноцитохимическим методом с использованием мышиных моноклональных антител к протеинам p53 (1:150), Mcl-1 (1:500), Ki-67 (1:250) и наборов для визуализации иммунных реакций (все реагенты Novocastra). Иммуноцитохимическое исследование проведено согласно стандартному протоколу.

Для электронно-микроскопического исследования ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, изучали в электронном микроскопе JEM-100S (Jeol, Япония). Для ультраструктурного анализа были сняты целые клетки и их фрагменты при увеличении на экране микроскопа 14000.

Для верификации секреторных гранул на ультраструктурном уровне использовали метод уранаффиновой реакции. Для этого осадок клеток фиксировали 3% глутаровым альдегидом на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 90 мин. После фиксации приготавливали блоки размером 1 мм и промывали 3 раза в 0,9% растворе в течение 15 мин, после чего помещали в 4% водный раствор уранилацетата (pH 3,9) на 18 ч при 4 °С. После промывки исследуемые объекты обезживали в спиртах и заключали в эпон.

Морфометрическое исследование проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400 (Nikon, Япония), цифровой камеры Nikon DXM1200 (Nikon, Япония), компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Видеотест-Морфология 4.0» (ВидеоТест, Россия).

В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 400. Оптическую плотность продуктов выявления экспрессии измеряли в условных единицах (усл. ед.). Площадь участков экспрессии рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах.

Одномоментную экспрессию двух молекул — маркеров дифференцировки тимоцитов — оценивали методом двухцветной проточной цитофлуориметрии с применением моноклональных антител к CD8, меченных флуоресцеинизотиоцианатом, и моноклональных антител к CD4, меченных фикоэритрином (Becton Dickinson, США). Для определения экспрессии антигенов клетки инкубировали с мечеными моноклональными антителами в течение 30 мин при 37 °С. Связывание антител, меченных флуорохромом, оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest 3.1 Software. В каждом случае в лучах аргонного лазера (мощность 15 мВт,

длина волны 488 нм) анализировали 10 000 клеток на образец при скорости потока 6000 клеток в 1 с.

Результаты исследований обрабатывали с помощью компьютерных программ EXCEL и STATISTICA 5.0 (Statsoft). Для сравнения средних значений применяли t-критерий Стьюдента при двустороннем уровне значимости 95%.

Результаты исследования. Морфометрический анализ показал, что изучаемые пептиды оказывают стимулирующее действие на пролиферацию незрелых кортикальных клеток (CD4⁺CD8⁺) и дифференцированных регуляторных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺).

Площадь участков экспрессии и оптическая плотность продукта выявления пролиферативного маркера Ki-67 на мембранах CD4⁺CD8⁺-клеток под действием пептида Т-38 значительно возрастала соответственно на 75% и 12% относительно контроля, однако пептид Т-32 не давал такого эффекта (таблица).

При этом эффект действия пептидов на дифференцированные CD4⁺CD25⁺-клетки был более выражен по сравнению с его влиянием на незрелые кортикальные клетки. Площадь участков экспрессии Ki-67 на поверхности регуляторных Т-лимфоцитов под действием обоих исследуемых пептидов возрастала в 2–2,3 раза, а оптическая плотность продукта выявления маркера — в 1,7–2 раза по сравнению с контролем (см. таблицу).

Кроме того, пептиды Т-32 и Т-38 предотвращали апоптоз дифференцированных и недифференцированных тимоцитов как за счет снижения экспрессии проапоптотического белка p53, так и за счет увеличения уровня антиапоптотического протеина Mcl.

При воздействии пептидов Т-32 и Т-38 на CD4⁺CD8⁺-клетки площадь участков экспрессии и оптическая плотность продуктов выявления белка p53 снижались приблизительно в 2 раза относительно контроля (см. таблицу), тогда как площадь участков экспрессии антиапоптотического маркера Mcl после инкубации кортикальных тимоцитов с пептидами возрастала в 1,4–1,5 раза. При этом исследуемые пептиды не оказывали влияния на оптическую плотность продуктов выявления экспрессии Mcl CD4⁺CD8⁺-клетками (см. таблицу).

Зрелые CD4⁺CD25⁺-клетки оказались менее чувствительными к воздействию пептида Т-38 на апоптоз по сравнению с кортикальными тимоцитами. Так, площадь участков экспрессии p53 регуляторными Т-клетками под действием пептида Т-38 не изменялась, а оптическая плотность продуктов выявления маркера уменьшалась всего лишь в 1,3 раза (см. таблицу). При этом площадь участков экспрессии и оптическая плотность продуктов выявления протеина p53 при введении в культуру с CD4⁺CD25⁺-клетками пептида Т-32

снижались относительно контроля соответственно в 2 и 2,2 раза (см. таблицу).

Оба исследуемых пептида способствовали повышению площади участков экспрессии антиапоптотического фактора Mcl в 1,5 раза относительно контроля как в кортикальных тимоцитах, так и в Т-регуляторных лимфоцитах (см. таблицу). Однако оптическая плотность продуктов выявления указанного маркера под действием пептидов Т-32 и Т-38 значимо не изменялась в $CD4^+CD8^+$ -клетках, но повышалась в 1,3 раза в дифференцированных Т-регуляторных клетках (см. таблицу).

Полученные данные были подтверждены результатами электронно-микроскопического исследования.

Пептиды Т-32 и Т-38 способствовали увеличению количества клеток с фигурами митозов среди одиночно расположенных незрелых кортикальных клеток (рис. 1, а). Ультраструктура кортикальных тимоцитов характеризовалась слабо развитым комплексом Гольджи, большим количеством митохондрий и рибосом, имеющих околядерную локализацию.

Под действием обоих изученных пептидов в органотипических пластах, образованных регуляторными Т-лимфоцитами, наблюдалось большое число вступивших в митоз клеток (рис. 1, б). В ядрах регуляторных Т-клеток увеличивалось содержание гетерохроматина. В цитоплазме зрелых тимоцитов при введении пептидов Т-32 и Т-38 увеличивалось содержание цистерн гранулярной эндоплазматической сети и элементов комплекса Гольджи, что указывает на усиление секреторной функции клеток.

Косвенные данные иммуноцитохимического исследования о возможной стимуляции пептидами Т-32 и Т-38 дифференцировки кортикальных $CD4^+CD8^+$ -timoцитов в Т-регуляторные клетки с фенотипом $CD4^+CD8^-$ были подтверждены результатами цитофлуориметрического анализа. В контрольной культуре тимоцитов количество $CD4^+CD8^-$ -клеток составило 4,3% при общем числе двойных положительных $CD4^+CD8^+$ -timoцитов 90,6%. Под действием пептида Т-38 число дифференцированных $CD4^+CD8^-$ -клеток

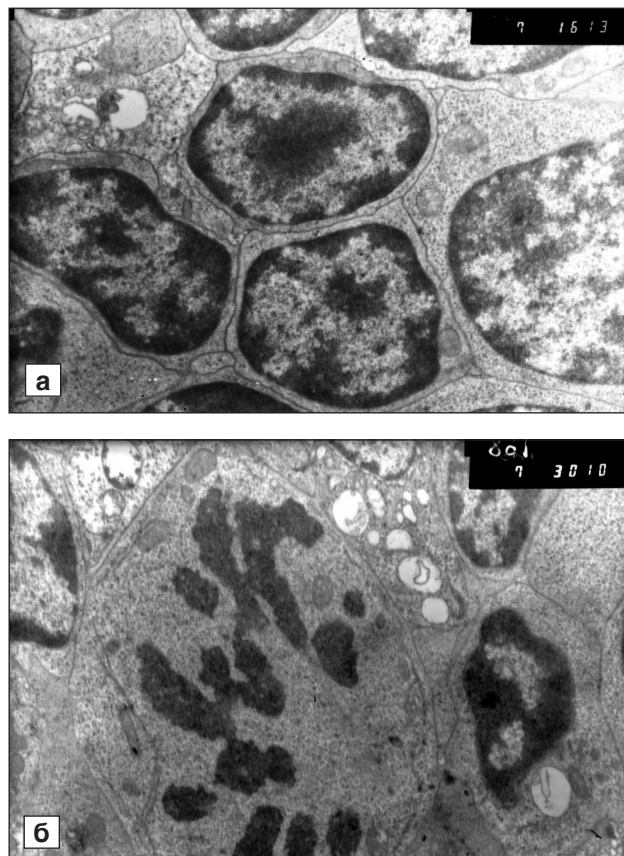


Рис. 1. Влияние пептида Т-38 на пролиферацию тимоцитов.

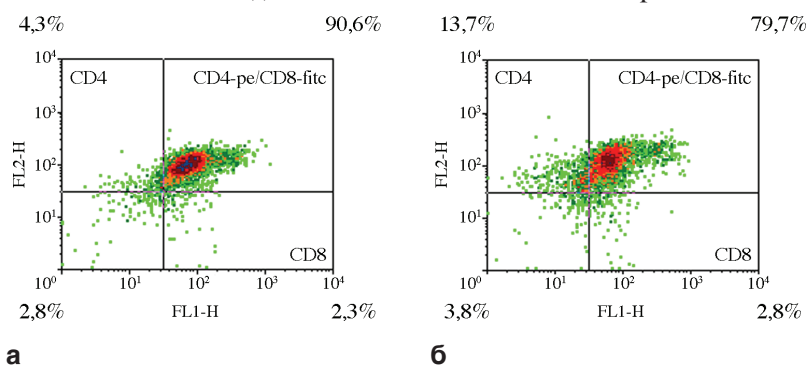
а — пролиферация незрелых кортикальных клеток ($CD4^+CD8^+$), б — делящийся регуляторный Т-лимфоцит ($CD4^+CD25^+$) в стадии метафазы. Ув. 14 000.

возрастало до 13,7%, а количество двойных положительных тимоцитов, соответственно снижалось до 79,7% (рис. 2, а, б).

Обсуждение полученных данных. Результаты иммуноцитохимического исследования свидетельствуют о том, что пептиды Т-32 и Т-38 являются индукторами дифференцировки кортикальных тимоцитов в направлении Т-регуляторных клеток, способствуя повышению их пролиферативной активности, снижению уровня их апоптоза и увеличению экспрессии антиапоптотических факторов. При этом эффект пептида Т-32 в большей степени проявляется в

Рис. 2. Соотношение $CD4^+CD8^+$ - и $CD4^+CD8^-$ -timoцитов. а — контрольная культура тимоцитов; б — культура тимоцитов в присутствии пептида Т-38. $CD4^+$ -клетки — два верхних квадранта, $CD8^+$ -клетки — два правых квадранта.

По оси абсцисс — количество тимоцитов, экспрессирующих маркер $CD8^+$, по оси ординат — количество тимоцитов, экспрессирующих маркер $CD4^+$.



Экспрессия маркеров пролиферации (Ki-67), апоптоза (p53) и антиапоптотического белка Mcl в субпопуляциях CD4⁺CD8⁺ и CD4⁺CD25⁺ иммунных клеток, $\bar{x} \pm L$

Показатели экспрессии маркеров	Контроль		Пептид Т-32		Пептид Т-38	
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺
S (Ki-67), %	2,1±0,4	1,6±0,3	2,8±0,5	3,26±0,3*	3,4±0,6*	3,99±0,2*
p (Ki-67), усл. ед.	2,7±0,04	2,1±0,08	2,7±0,03	4,1±0,4*	2,9±0,04*	3,6±0,5*
S (p53), %	0,4±0,07	0,5±0,03	0,2±0,05*	0,3±0,02*	0,2±0,04*	0,4±0,03
p (p53), усл. ед.	2,7±0,4	3,0±0,3	1,3±0,23*	1,3±0,19*	1,3±0,3*	2,1±0,05*
S (Mcl), %	4,0±0,4	2,73±0,3	5,8±0,5*	4,3±0,3*	5,7±0,5*	4,4±0,4*
p (Mcl), усл. ед.	2,1±0,3	1,94±0,2	2,4±0,4	3,12±0,3*	2,6±0,4	3,0±0,3*

* Различия значимы по сравнению с контролем при P<0,05.

S — площадь участков экспрессии (%); p — оптическая плотность продуктов выявления маркеров (усл. ед.).

отношении зрелых CD4⁺CD25⁺-клеток, тогда как действие пептида Т-38 было направлено преимущественно на незрелые CD4⁺CD8⁺-тимocyты. Электронно-микроскопические и цитометрические исследования позволили подтвердить результаты, полученные методом иммуноцитохимии, и указывают на то, что синтетические пептиды Т-32 и Т-38 являются эффективными стимуляторами дифференцировки и пролиферации, а также ингибиторами апоптоза тимocyтов на различных стадиях их развития.

Полученные данные согласуются с результатами исследования, в котором было установлено стимулирующее влияние синтетических пептидов тимуса и эпифиза на дифференцировку полипотентных клеток [3, 4]. Кроме того, ранее было показано, что пептидные препараты сетчатки стимулируют пролиферативную активность ее пигментного эпителия [3]. На основании полученных нами экспериментальных данных и имеющихся в литературе сведений, можно предположить, что в основе пептидной регуляции лежит способность к стимуляции пролиферативной активности клеток и их дифференцировки, однако, следует учитывать, что указанные эффекты в различных тканях достигаются только под действием определенного вида пептидов.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что пептиды Т-32 и Т-38 являются препаратами, способствующими повышению функциональной активности тимуса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О. и Князькин И.В. Нейроиммуноэндокринология тимуса. СПб., Деан, 2005.
2. Полякова В.О. и Кветной И.М. Тимус и старение (нейроиммуноэндокринные механизмы). СПб., Система, 2004.
3. Трофимова С.В., Максимов И.Б. и Нероев В.В. Регуляторное действие пептидов сетчатки. СПб., Коста, 2004.
4. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. СПб., Наука, 2009.
5. Хавинсон В.Х. и Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. СПб., Наука, 2003.

6. Хавинсон В.Х., Рыбакина Е.Г. и Малинин В.В. Влияние коротких пептидов на реакцию бласттрансформации тимocyтов и процесс сигнальной трансдукции по сфингомиелиновому пути. Бюлл. exper. биол., 2002, т. 133, № 5, с. 574–577.
7. Ярилин А.А. и Беляков И.М. Тимус как орган эндокринной системы. Иммунология, 1996, № 1, с. 4–10.
8. Anisimov V.N. and Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects. Biogerontology, 2010, v. 11, p. 139.
9. Khavinson V.Kh. and Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel, Karger AG, 2005.
10. Khavinson V.Kh. and Morozov V.G. Peptides of pineal gland and thymus prolong human life. Neuroendocrinol. Lett., 2003, v. 24, № 3–4, p. 233–240.
11. Kvetnoy I.M., Hernandez-Yago J., Hernandez J.M. et al. Diffuse neuroendocrine system and mitochondrial diseases: molecular and cellular bases of pathogenesis, new approaches to diagnosis and therapy. Neuroendocrinol. Lett., 2000, v. 21, v. 2, p. 83–99.
12. Kvetnoy I.M., Polyakova V.O., Trofimov A.V. et al. Hormonal function and proliferative activity of thymic cells in humans: immunocytochemical correlations. Neuroendocrinol. Lett., 2003, v. 24, p. 263–268.
13. Yamamoto T., Morita S. and Go R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2010, v. 77, № 1, p. 235–243.

Поступила в редакцию 07.12.2010
Получена после доработки 25.01.2011

CHANGES OF THYMOCYTE DIFFERENTIATION, PROLIFERATION AND APOPTOSIS INDUCED BY SYNTETIC PEPTIDES

*A.A. Yarilin, V.Kh. Khavinson, V.O. Polyakova,
N.S. Lin'kova and I.M. Kvetnoy*

The changes in the processes of differentiation, proliferation and apoptosis were studied in the culture of human cortical thymocytes after cell exposure to T-32 and T-38 bioregulator peptides. T-32 and T-38 peptides were shown to enhance the differentiation of immature cortical thymocytes (CD4⁺CD8⁺) into T-regulatory cells by increasing their proliferate activity and decreasing the level of apoptosis. Moreover, these peptides were found to stimulate the proliferative and antiapoptotic activity of mature T-regulatory (CD4⁺CD25⁺) cells.

Key words: thymocytes, differentiation, proliferation, apoptosis, peptides

Department of Pathological Morphology, RAMS North-Western Branch St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology